

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-186296

⑬ Int.Cl.¹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)9月21日

C 12 P 19/22

7110-4B

審査請求 有 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 デンプンの糖化方法

⑯ 特 願 昭59-43370

⑰ 出 願 昭59(1984)3月7日

⑱ 発 明 者 高 崎 義 幸 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

⑲ 出 願 人 工 業 技 術 院 長

⑳ 指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所長

明 細 書

1. 発明の名称

デンプン糖化方法

2. 特許請求の範囲

バシルス属の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼでデンプンを糖化してマルトースを製造するに際し、エロバクター属またはクレブシラ属のプルラーゼを存在させることを特徴とする高純度マルトースの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はデンプンから高純度マルトースの製造法に関するものである。

植物または微生物の生産する β -アミラーゼをデンプンに作用させると、デンプン中のアミロースとアミロペクチンの非還元性末端からマルトースが生成する。しかし、アミロペクチンの α -1,6-グルコシド結合は β -アミラーゼによつて分解されないため、 α -1,6-グルコシド結合付近で分解が止り、後にデキストリン(β -リミットデキストリン)を残すことになる。 β -アミラーゼ

と共に、アミロペクチン(または β -リミットデキストリン)の α -1,6-グルコシド結合を分解する酵素を存在させてデンプンを糖化させるときマルトースの収量が増収できることはよく知られている(たとえば、Z.H.Gunjaら、Biochem.J. 81, 392(1961)など)。

α -1,6-グルコシド結合を分解する酵素は、その給源、基質特異性などにより、イソアミラーゼ、プルラーゼ、アミロ-1,6-グルコシダーゼなどと呼ばれているが、総称して α -1,6-グルコシダーゼといわれる。

本発明者は、先に、バシルス属細菌が、デンプンからマルトースを高収量で生産するのに必要な β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼからなる複合酵素を同時に生産することを認めた(特公昭53-5749など、及びAgric.Biol.Chem., 40, 1515(1976)など)。この酵素によれば、各種デンプンから最高88%の収量でマルトースを生産することができる(日本農芸化学会誌、53, 77(1979))。

しかし、デンプンを糖化したマルトース含有液からマルトースを結晶として収量よく回収するためには、マルトース含有液のマルトース純度を、少なくとも90%以上に高めることが要求される。そこで、本発明者は、前記複合酵素を用いたデンプン糖化において、マルトース含量を高める方法について鋭意研究を行ってきた結果、デンプンをバシルス属 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼで糖化するに際し、エーロバクター属またはクレブシラ属のプルラナーゼを存在させて糖化するとマルトースの収量が增加できることを認めた。本発明はこの知見にもとずいてなされたものである。

すなわち、本発明は、バシルス属の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼでデンプンを糖化してマルトースを製造するに際し、エーロバクター属またはクレブシラ属のプルラナーゼを存在させることを特徴とする高純度マルトースの製造方法に関するものである。

以下に本発明の内容を詳細に説明する。

エーロバクター属菌株 (*Aerobacter aerogenes*) の生産するプルラナーゼは、最初、Bender により、プルラリヤ・プルランの生産する多糖類プルランを分解する酵素として発見された (*Biochem. Biophys. Acta*, 36, 309 (1959)) が、その後、同じ属種の菌株のプルラナーゼが多くの研究者により研究されている (たとえば、*Method in Enzymology*, 33, 555 (1966), *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2821 (1973) など)。また、クレブシラ属菌株による α -1,6-グルコシダーゼの生産については、たとえば、特公昭51-5072に記載されている。

エーロバクター・エーロゲネスは、現在、Bergeyの細菌同定書 (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The William & Wilkins Co. 第8版) においては、クレブシラ・ニューモニア (*Klebsiella pneumoniae*) に統合されている。本発明において使用される、エーロバクター属またはクレブシラ属のプルラナーゼとは、この属種の菌株の生産するプルラナーゼをさし、これら属種の菌株の酵素

はすでに市販されている。

本発明は、このような市販のエーロバクター属またはクレブシラ属のプルラナーゼ^もを使用することができるが、本発明者により発明された、クレブシラ・ニューモニア FERM P-7387 の生産する新規なプルラナーゼを用いることができる。本酵素は最適作用 pH が約 4.5 ~ 約 7.5、最適温度が 60 ~ 63 °C の極めて広い pH 範囲に作用する熱安定のプルラナーゼであり、 α -アミラーゼやトランスグルコシダーゼなどマルトースの生産にとって妨害となる酵素を殆んど含んでいないため、本発明をより効果的に実施することができる。本酵素の酵素的性質の概要は以下の通りである。

- (1) 作用：プルランの α -1,6-グルコシド結合を分解してマルトリオースを生成する。
また、澱粉、アミロペクチン、グリコーゲンまたはこれらの派生物の α -1,6-グルコシド結合を分解する。
- (2) 作用 pH 範囲及び最適作用 pH: pH 約 2.5 ~ 約 10 の極めて広い pH 範囲で作用し、最適作用

温度は pH 約 4.5 ~ 約 7.5 の広い範囲に認められた (2% プルラン, 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 3 ~ 5.5)、トリス緩衝液 (pH 5.5 ~ 7.5) およびトリシン緩衝液 (pH 7 ~ 8.5) のもとで 50 °C で 30 分間反応)

- (3) 作用温度範囲及び最適作用温度: 約 7.5 °C まで作用し、最適作用温度は約 63 °C に認められた (2% プルラン, 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 又は 0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.0) のもとで 30 分間反応)。
- (4) 熱安定性: 酵素水溶液を 50 °C、55 °C と 60 °C で加熱処理してのち、残存活性を測定した。その結果、50 °C では 1 時間の加熱後も失活は殆んど認められなかった。55 °C の加熱では 20 分の加熱で約 20 % 失活し、1 時間の加熱で約 60 % 失活した。そして、60 °C の加熱では 30 分間の加熱で約 80 % 失活した。
- (5) pH 安定性: pH 約 4 ~ 約 10 の範囲で安定であ

つた(0.1 M酢酸緩衝液、リン酸緩衝液またはトリス緩衝液のもと、室温(25℃)で3時間放置後、残存活性を測定した。

- (6) 阻害剤：本酵素は 1×10^{-1} Mの CuSO_4 、 HgCl_2 、 ZnSO_4 、 FeSO_4 により、それぞれ約93%、約89%、約86%、約29%阻害された。同濃度の AgNO_3 によつては殆んど阻害されなかつた。

- (7) 精製方法：本酵素は培養上澄液から硫酸分画(40~70%飽和)、DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィー(KCl 0~0.5 Mでリニヤーグラジエント溶出)とセファデックスG-200カラムクロマトグラフィーにより、クロマト的、電気泳動的に均一まで精製することができる。

- (8) 分子重：セファデックスG-200ゲル濾過法により測定した分子重は約12万であった。

- (9) 力価測定法：0.1 Mトリス緩衝液に溶解させ

た1%プルラン液(pH7.0) 0.5 mlに適量の酵素を加え、水で全量1 mlとし40℃で反応させる。この条件で1時間に1mgのグルコースに相当する還元力を生成する酵素量を1単位とした。

本発明により、デンプンの糖化するには、DE(デンプンの分解率を示す指標、固形分中の還元力をグルコースとして表わした百分率)10以下の液化デンプンを10~40%濃度で、pH5~7、温度50~60℃でおこなわれる。

次に、実施例により本発明の詳細を説明する。

実施例 1

DE 1.4の液化デンプン液(固形分として1%に、バシルス・セレウス・バリエータス・ミコイ(農研報告第239号)デンプンの生産するβ-アミラーゼとα-1,6-グルコシダーゼ(FERMP-2391を用い、Agric. Biol. Chem., 48, 1515 (1976)、特公昭53-5749により調製した。同酵素は北海道糖業(株)より入手することができる)それぞれ300単位と30単位(単位の定義は前記文献に

よつた)とクレブシラ・ニューモニアドERMP-7387の生産するプルラーゼを0.5または1単位を加え、pH6~6.5、温度50℃で44時間糖化した。糖化液の糖組成を高速液体クロマトグラフィーにより定量的した結果は第1表に示す通りであつた。

表から明らかなるように、バシルス属β-アミラーゼとα-1,6-グルコシダーゼに加えて、クレブシラ・ニューモニアのプルラーゼを1単位加えて糖化すると、無添加の場合に比べ、その他の成分(オリゴ糖)が低下し、マルトースの収量が2.9%増加した。

実施例 2

実施例1において、クレブシラ・ニューモニアのプルラーゼの代りに、市販のエーロバクター・エーロゲネスのプルラーゼを用いて、実施例1と同様にして、デンプンの糖化を行つた、得られた結果は第2表の通りであつた。

表 1

β-アミラーゼ	α-1,6-グルコシダーゼ	グルコース マルトース アントトリアース その他			
バシルス属 300単位	バシルス属 30単位	クレブシラ属 0単位	バシルス属 30単位	クレブシラ属 0単位	バシルス属 30単位
0	0	0	0.0	88.9	6.7
0	0	0.5	0.0	90.7	7.2
0	0	1.0	0.0	91.8	6.8
300	0	1.0	0.0	83.2	5.8
300	0	2.0	0.0	88.3	7.0
0	0	0	0.0	4.9	4.7

第 2 表

バシルス属 β -アミラーゼ	バシルス属 α -1.6-グルコシダーゼ	エーロバクター属 プルラーナーゼ	マルトース収量
300 単位	30 単位	0 単位	88.9 %
300	30	1.0	90.1